

# Heat shock protein 90 $\alpha$ is a potential serological biomarker of acute rejection after renal transplantation

PLoS One 2016; 11(9): e0162942. doi: 10.1371/journal.pone.0162942

Maehana T, Tanaka T, Kitamura H, Fukuzawa N,  
Ishida H, Harada H, Tanabe K, Masumori N.

**要旨** 臓器移植における拒絶反応と Heat Shock Protein 90 $\alpha$  (HSP90 $\alpha$ ) の関係を解析した。血清 HSP90 $\alpha$  値は腎移植後急性拒絶反応、特に血管炎を伴う重度の急性拒絶反応の病態を反映するバイオマーカーとなり得る事が示唆された。

## 1. 背景

Heat shock protein (HSP) は近年免疫応答に関与することが明らかとなっている。Saito らは自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス (SLE) の患者血清中の HSP90 $\alpha$  濃度が高値であること、治療後にこの値が低下すること、さらに SLE 動物モデルにて HSP90 阻害剤が病勢の進行を抑制することを明らかにした<sup>1)</sup>。HSP90 が自己免疫応答にも関与するということから、同種免疫反応でも関与が見られるものと推察され、本研究において腎移植などの同種臓器移植における拒絶反応への HSP90 $\alpha$  の関与を明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究方法

### 2・1 腎移植患者における血清 HSP90 $\alpha$ 濃度と拒絶反応およびその治療経過との関係

腎移植後患者 70 症例、96 検体の保存血清を用い、血清 HSP90 $\alpha$  濃度を ELISA 法にて測定した。急性拒絶反応発症例、拒絶反応非発症例、慢性拒絶反応症例、薬剤性腎機能障害例、ウイルス感染症発症例において血清 HSP90 $\alpha$  濃度を測定し、臨床的特徴と血清 HSP90 $\alpha$  濃度の関係について解析した。

### 2・2 In vitro 抗体関連型拒絶反応モデルの作成と HSP90 $\alpha$ の関係

Human Aortic Endothelial Cells (HAEC) を用いて、まず PCR-SBT 法による HLA typing を施行した。これに特異的な抗 HLA 抗体陽性患者血清 (抗 HLA 抗体は Luminex で検出) より IgG を抽出して、HAEC と共培養した。対照群として、非感作ボランティア血清より精製した IgG を使用し、共培養した。免疫染色で HAEC に特異的に抗 HLA 抗体が結合していることを確認後、補体依存性抗体媒介細胞障害 (CDC) における培養上清の HSP90 $\alpha$  をフローサイトメトリーと ELISA で解析した。

### 2・3 マウス同種皮膚移植モデルにおける HSP90 $\alpha$ の関与の解析

C57BL/6 (H-2b) をドナー、BALB/c (H-2d) をレシピエントとした MHC 完全不一致マウス皮膚移植をおこない、移植前、移植後 7 日目、拒絶時の血清 HSP90 $\alpha$  値を ELISA 法にて測定した。さらに移植後 14 日目に 2 次皮膚移植を行い、急性抗体関連型拒絶反応モデルを作成し、同様に拒絶前後で血清 HSP90 $\alpha$  値を測定した。対照群として同系皮膚移植 (BALB/c  $\rightarrow$  BALB/c) も行った。

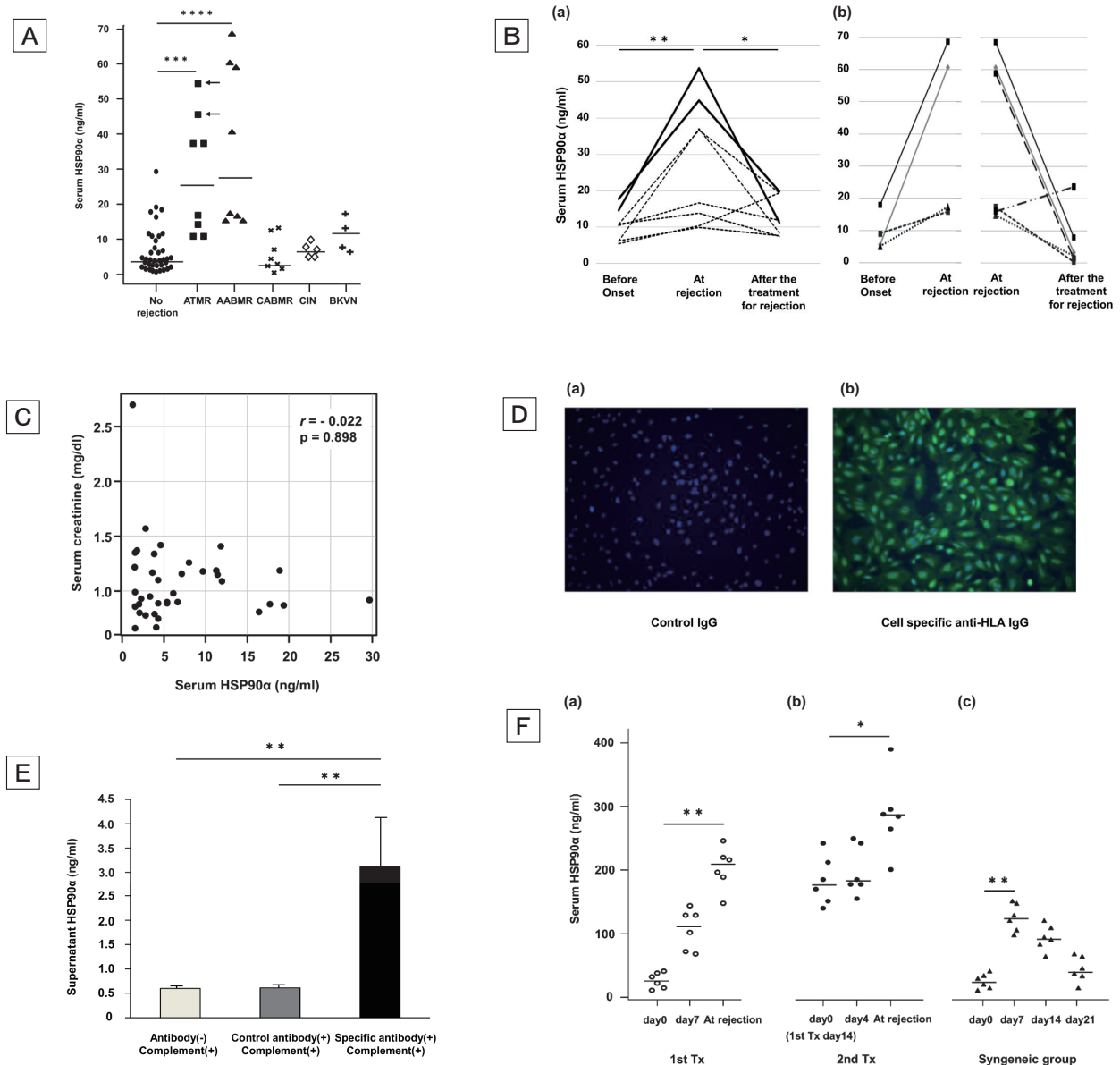
## 3. 結果

### 3・1 腎移植患者における血清 HSP90 $\alpha$

患者血清 HSP90 $\alpha$  値は急性 T 細胞性拒絶反応 (ATMR) 発症時には非発症例と比較し有意に上昇し (中央値 26.71ng/ml vs 4.05ng/ml,  $p<0.001$ )、血管炎を伴う急性抗体関連型拒絶反応 (AABMR) 例はさらに高値 (中央値 28.79ng/ml vs 4.05ng/ml,  $p<0.0001$ ) である傾向を認めた (図 A)。急性拒絶反応中に高値を示した HSP90 $\alpha$  値は、拒絶反応の治療後には拒絶発症前の血清 HSP90 $\alpha$  濃度と同程度まで低下した (図 B)。一方で慢性拒絶反応、その他の移植腎障害では血清 HSP90 $\alpha$  の上昇を認めなかった。さらに血清クレアチニン値と HSP90 $\alpha$  値の相関を解析したが、各群で相関は認めず、血清 HSP90 $\alpha$  はクレアチニン値と相関関係が無い事を明らかにした (図 C)。

### 3・2 In vitro 抗体関連型拒絶反応モデルと HSP90 $\alpha$

蛍光免疫染色にて、抗 HLA IgG はコントロールに比して HAEC へ強い結合を認めた (図 D)。共培養後、培養細胞中の HSP90 陽性細胞をコントロールと比較すると、抗 HLA IgG 群では対照群に対し陽性細胞の増加を認めた。さらに補体を添加し、補体依存性細胞傷害の影響を見るため、培養上清の HSP90 $\alpha$  濃度を ELISA で解析した結果、抗 HLA IgG 群は非特異 IgG を用いたコントロール群と比較し有意に高かった ( $3.11 \pm 1.02$  ng/ml vs  $0.61 \pm 0.02$  ng/ml,  $p<0.01$ , 図 E)。



- A. 腎移植後患者血清 HSP90  $\alpha$  値。  
 B. 急性拒絶反応症例の HSP90  $\alpha$  値の推移。 a: ATMR group, b: AABMR group  
 C. 非拒絶反応発症群における血清クレアチニン値と HSP90  $\alpha$  値の相関図。  
 D. 免疫染色による HAEC の評価。 a: Control 群, b: 抗 HLA 抗体群, Pseudo-green: 抗ヒト IgG 抗体, Pseudo-blue: DAPI  
 E. HAEC 培養上清上の HSP90  $\alpha$  濃度。  
 F. マウス皮膚移植における血清 HSP90  $\alpha$  値。 a: 1 次移植群, b: 2 次移植群, c: 同系皮膚移植群

### 3・3 マウス皮膚移植における HSP90 $\alpha$

血清 HSP90  $\alpha$  値は拒絶反応時に移植前と比較し有意に上昇し（中央値 206.86ng/ml vs 24.33ng/ml,  $p<0.01$ ）、二次移植後拒絶反応時にはさらなる上昇を認めた（中央値 286.03ng/ml vs 178.22ng/ml,  $p<0.05$ ）。一方で対照群である同系皮膚移植では、移植 7 日目にベースライン値より 4 倍程度の上昇（124.47ng/mL vs 24.33ng/mL,  $p<0.01$ ）を認めたが、14 日目には低下を認め、21 日目での解析ではほぼベースライン値まで回復した（図 F）。

### 4. 参考文献

- Saito K, Kukita K, Kutomi G, Okuya K, Asanuma H, Tabeya T,

et al. Heat shock protein 90 associates with Toll-like receptors 7/9 and mediates self-nucleic acid recognition in SLE. Eur J Immunol 2015; 45: 2028-2041.

### 前鼻 健志

#### 略歴

- 2005 年 札幌医科大学医学部卒業
- 2007 年 札幌医科大学医学部泌尿器科学講座入局
- 2013 年 札幌医科大学大学院医学研究科
- 2014 年 市立札幌病院腎臓移植外科